

**IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN *MYOSTATIN* (MSTN) PADA
DOMBA DORPER**

SKRIPSI

Oleh:

IQBAL ASH SHIDIQIE RIVANDA



**PROGRAM STUDI S-1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026**

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN *MYOSTATIN* (MSTN) PADA DOMBA
DORPER

Oleh

IQBAL ASH SHIDIQIE RIVANDA
NIM: 23010122140148

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Peternakan pada Program Studi S-1 Peternakan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S-1 PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Iqbal Ash Shidiqie Rivanda

NIM : 23010122140148

Program studi : S-1 Peternakan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul **Identifikasi Keragaman Gen *Myostatin* (MSTN) pada Domba Dorper** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Bapak Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D** dan **Bapak Asep Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Peternakan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, Juni 2026

Penulis,



Iqbal Ash Shidiqie Rivanda

Mengetahui:

Pembimbing Utama

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'S' followed by a horizontal line and a small flourish.

Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D

Pembimbing Anggota

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, circular loop followed by a horizontal line and a small flourish.

Asep Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D

Judul Skripsi : IDENTIFIKASI KERAGAMAN GEN
MYOSTATIN (MSTN) PADA DOMBA
DORPER

Nama Mahasiswa : IQBAL ASH SHIDIQIE RIVANDA

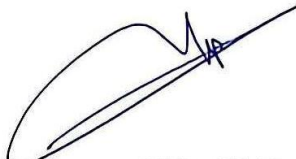
Nomor Induk Mahasiswa : 23010122140148

Program Studi/Departemen : S-1 PETERNAKAN / PETERNAKAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

Telah disidangkan dihadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal...~~1~~**7**..JUN..2026

Pembimbing Utama



Ir. Sutopo, M.Sc. Ph.D

Pembimbing Anggota



Ascp Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D

Ketua Program Studi



Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program

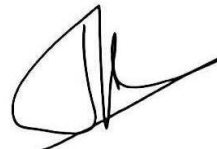


Prof. Ir. Vitus D. Y. B. I., M.S., M.Sc., Ph.D., IPU



Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen



Dr. Ir. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM

RINGKASAN

IQBAL ASH SHIDIQIE RIVANDA. 23010122140148. 2026. Identifikasi Keragaman Gen *Myostatin* (MSTN) pada Domba Dorper. (Pembimbing: **SUTOPO** dan **ASEP SETIAJI**).

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman gen *Myostatin* (MSTN) domba Dorper. Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus – November 2025 bertempat di Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 50 sampel darah domba Dorper yang diperoleh dari peternakan di Kabupaten Malang melalui metode *purposive sampling* dengan kriteria domba Dorper berumur 8 bulan hingga 4 tahun. Sampel darah diambil sebanyak 3 ml melalui *vena jugularis* dan disimpan dalam tabung EDTA. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA Extraction Kit* dari Geneaid, kemudian gen MSTN diamplifikasi melalui teknik PCR menggunakan mesin Bio-Rad T100 dengan sepasang primer spesifik yang menghasilkan amplikon sepanjang 1.078 bp yang mencakup wilayah parsial intron 2 dan parsial ekson 3. Hasil amplifikasi divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarose 1% dan sekuensing dilakukan menggunakan metode Sanger di PT. Genetika Science Indonesia. Data hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan software MEGA 12 dan DnaSP v6. Parameter yang diamati adalah keragaman genetik, frekuensi genotipe, frekuensi alel, heterozigositas dan nilai kesetimbangan Hardy Weinberg.

Hasil penelitian menunjukkan satu *segregation site* yang tergolong *parsimony informative site* pada posisi 350 atau g.5334, berupa mutasi transversi dari adenin ke sitosin (A>C) yang berlokasi di wilayah intron 2. Mutasi ini menghasilkan tiga genotipe, yaitu AA dengan frekuensi tertinggi sebesar 81%, AC sebesar 14%, dan CC sebesar 5%. Frekuensi alel A (0,88) lebih dominan dibandingkan alel C (0,12). Nilai heterozigositas pada situs g.5334 sebesar 20,97%, yang termasuk dalam kategori sedang, serta populasi berada dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg (χ^2 hitung 4,27 $\leq$ χ^2 tabel 5,99).

KATA PENGANTAR

Domba Dorper merupakan bangsa domba pedaging asal Afrika Selatan yang dikembangkan pada tahun 1930-an melalui persilangan antara domba Dorset Horn jantan dengan domba Blackhead Persian betina, dengan tujuan menghasilkan domba rambut berdaya produksi tinggi, tahan iklim, dan mudah dirawat. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keragaman gen *myostatin* pada domba Dorper menggunakan pendekatan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) sebagai dasar penyusunan program seleksi dan pemuliaan.

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. yang telah melimpahkan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul Identifikasi Keragaman Gen *Myostatin* (MSTN) pada Domba Dorper dapat selesai dilakukan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama melakukan penelitian hingga penyusunan laporan ini dapat terselesaikan, terutama kepada :

1. Ir. Sutopo, M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing utama dan Asep Setiaji, S.Pt., M.Si., Ph.D. selaku dosen pembimbing anggota serta Koordinator Laboratorium Genetika Pemuliaan, dan Reproduksi atas dukungan dalam bentuk kesempatan, bimbingan, dan masukan dalam melaksanakan kegiatan penelitian hingga penulisan skripsi;
2. Dr. Ir. Achiriah Febriana, S.Pt., M.Si., IPM. selaku pembimbing lapangan atas dukungan dalam bentuk kesempatan, bimbingan, dan masukan dalam melaksanakan kegiatan penelitian;

3. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian yang telah memfasilitasi dan mendukung secara penuh kegiatan penelitian dan penulisan skripsi;
4. Dr. Sri Sumarsih, S.Pt., M.P., IPM. selaku Ketua Departemen Peternakan dan Ir. Rudy Hartanto, S.Pt., M.P., Ph.D., IPM. selaku Kepala Program Studi S1 Peternakan yang telah memfasilitasi dan secara penuh kegiatan penelitian dan penulisan skripsi;
5. Prof. Ir. Retno Murwani, M.S., M.App.Sc., Ph.D. selaku dosen wali yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama menjalankan studi di program studi S1 Peternakan;
6. Kedua orang tua penulis dan saudara kandung penulis yang telah memberikan dukungan secara moral;
7. Evi, Ilak dan Zerli selaku partner penelitian yang telah bekerja sama sejak penelitian dimulai hingga akhir;
8. Teman-teman asisten Genetika, Pemuliaan, dan Reproduksi angkatan 2022 yang telah membantu selama proses penelitian;
9. Pihak-pihak terlibat yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak di kemudian hari.

Semarang, Juni 2026

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR ILUSTRASI.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Domba Dorper.....	3
2.2. Gen Myostatin.....	3
2.3. Ekstraksi DNA dan PCR.....	4
2.4. Elektroforesis dan Sekuensing DNA.....	5
2.5. Mutasi dan Keragaman Genetik.....	6
2.6. Heterozigositas dan Hardy Weinberg.....	7
BAB III MATERI DAN METODE.....	9
3.1. Materi.....	9
3.2. Metode.....	10
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17

4.1. Hasil Amplifikasi Gen MSTN Domba Dorper.....	17
4.2. Hasil Sekuensing Gen MSTN Domba Dorper.....	18
4.3. Keragaman Genetik.....	19
4.4. Frekuensi Genotipe.....	21
4.5. Frekuensi Alel.....	23
4.6. Heterozigositas dan Nilai Kesetimbangan Hardy Weinberg.....	24
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	26
5.1. Simpulan.....	26
5.2. Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	27
LAMPIRAN.....	34
RIWAYAT HIDUP.....	113

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Tahapan <i>Polymerase chain reaction</i>	13
2. Data Analisis Sekuen MSTN Domba Dorper.....	18
3. Situs mutasi, Kromatogram dan Jenis Mutasi Gen MSTN...	20
4. Frekuensi Genotipe Gen MSTN Domba Dorper.....	22
5. Frekuensi Alel Gen MSTN Domba Dorper.....	23
6. Heterozigositas dan Hardy Weinberg Equilibrium.....	24

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor	Halaman
1. Tahapan Ekstraksi DNA.....	12
2. Simulasi penempelan primer pada analisis PCR.....	14
3. Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen MSTN.....	17

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Langkah analisis sekuen menggunakan MEGA 12.....	34
2. Langkah Perhitungan Mutasi dan Keragaman Nukleotida menggunakan DnaSP.v6.....	37
3. Kromatogram Titik Mutasi Tiap Sampel.....	40
4. Langkah Pembuatan Primer Menggunakan Primer3 Plus....	46
5. Hasil Alignment Gen MSTN Domba Dorper.....	49

BAB I

PENDAHULUAN

Domba Dorper merupakan bangsa domba pedaging yang berasal dari Afrika Selatan yang pertama kali dikembangkan pada tahun 1930-an melalui persilangan antara domba Dorset Horn jantan dan domba Blackhead Persian betina (Wang *et al.*, 2025). Domba Dorper memiliki keunggulan seperti pertumbuhan cepat, kemampuan produksi daging yang baik, serta ketahanan terhadap penyakit, terutama parasit, menjadikannya sangat cocok dipelihara di daerah tropis seperti Indonesia (Pramujo *et al.*, 2025).

Guna memaksimalkan potensi genetik domba Dorper ini, diperlukan pemahaman mendalam tentang faktor-faktor genetik yang mengontrol pertumbuhan dan perkembangan otot, yang merupakan penentu utama produksi daging. Salah satu faktor genetik paling krusial yang mengatur massa otot adalah gen *Myostatin* (MSTN). Gen ini mengkode protein yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan negatif dalam keluarga TGF- β , yang secara spesifik menghambat proliferasi dan diferensiasi sel-sel otot rangka (Batubara, 2017). Mutasi pada gen MSTN dapat menyebabkan kehilangan fungsi gen maupun penghambatan ekspresinya sehingga mengakibatkan mekanisme pengendalian pertumbuhan otot menjadi tidak aktif (Bouyer *et al.*, 2014). Hal tersebut memicu peningkatan massa otot secara berlebihan yang secara ilmiah disebut hipertrofi, atau lebih dikenal dengan istilah *double-muscling*.

Mutasi pada gen MSTN telah terbukti berkorelasi dengan peningkatan massa otot, pertumbuhan yang lebih cepat, dan perbaikan kualitas karkas pada berbagai spesies ternak (Haren *et al.*, 2020), seperti yang ditunjukkan sapi Hanwoo (Han *et al.*, 2012), domba Putih Norwegia (Boman *et al.*, 2010) domba Hu (Guo *et al.*, 2023). Oleh karena itu, MSTN merupakan gen kandidat utama yang menjadi fokus dalam program pemuliaan ternak yang bertujuan meningkatkan produksi daging.

Informasi mengenai keragaman genetik gen MSTN pada populasi domba Dorper masih sangat terbatas. Identifikasi keragaman ini sangat diperlukan untuk menyediakan informasi genetik yang berharga guna memandu program seleksi dan pemuliaan yang lebih efektif dengan menggunakan pendekatan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), keragaman DNA dapat dikaitkan dengan sifat kuantitatif, yang memungkinkan implementasi seleksi berdasarkan marka genetik (*Marker Assisted Selection/MAS*) (Sharma *et al.*, 2024).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi keragaman gen MSTN domba Dorper. Manfaat dari kegiatan penelitian ini adalah menyediakan informasi marka genetik pada gen MSTN Domba Dorper yang dapat digunakan untuk seleksi berdasarkan marka genetik (*Marker Assisted Selection/MAS*). Diduga bahwa terdapat SNP pada gen MSTN domba Dorper.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Domba Dorper

Domba Dorper merupakan bangsa domba pedaging yang berasal dari Afrika Selatan yang pertama kali dikembangkan pada tahun 1930-an melalui persilangan antara domba Dorset Horn jantan dan domba Blackhead Persian betina (Wang *et al.*, 2025). Domba Dorper dikembangkan dengan tujuan untuk menghasilkan domba rambut yang memiliki produksi daging yang cepat dan tahan terhadap perubahan iklim serta mudah dirawat (Qiao *et al.*, 2022). Domba Dorper sebagai domba pedaging mampu mencapai bobot $21,91 \pm 5,20$ kg pada umur 4 bulan dengan PBBH $0,155 \pm 0,04$ kg/hari (Sholikhah *et al.*, 2021). Ciri khas domba Dorper adalah memiliki kepala dan leher bagian atas yang hitam, sementara seluruh tubuhnya berwarna putih (Wanjala *et al.*, 2023).

2.2. Gen *Myostatin*

Deoxyribonucleic Acid (DNA) merupakan senyawa yang menyimpan informasi genetik organisme dan mewariskannya dari generasi ke generasi berikutnya (Sabrina *et al.*, 2022). *Deoxyribonucleic Acid* adalah rantai polinukleotida ganda dengan komponen penyusun meliputi gula deoksiribosa, fosfat, dan basa nitrogen (adenin, guanin, timin, dan sitosin) (Nur'aini *et al.*, 2019). *Deoxyribonucleic Acid* dapat ditemukan di dalam nukleus, mitokondria pada hewan, serta kloroplas pada tumbuhan (Furqoni *et al.*, 2017). Untaian rantai DNA

mengandung gen yang diperintahkan untuk menghasilkan protein (Alberts *et al.*, 2002). Protein yang diproduksi oleh gen berfungsi sebagai biokatalis, pembentuk struktur sel, dan regulator aktivitas metabolisme (Azmi *et al.*, 2025).

Gen MSTN merupakan gen yang terekspresi pada perkembangan otot skeletal (Lee dan McPherron, 2001). Gen MSTN pada domba Dorper terletak pada kromosom kedua dan terdiri dari tiga ekson dan dua intron (Zhao *et al.*, 2024). Gen MSTN memiliki panjang 6.757 bp, sementara transkripnya tersusun atas 1.128 bp yang mengkode protein dengan 375 asam amino (Grochowska *et al.*, 2020). Gen MSTN atau disebut juga *Growth Differentiation Factor 8* (GDF8) memiliki karakteristik khusus sebagai penghambat pertumbuhan massa otot (Pan *et al.*, 2024). Adanya mutasi atau kerusakan pada gen ini memicu terjadinya peningkatan signifikan pada massa otot, sebuah kondisi yang dikenal sebagai hipertrofi otot (Ayuti *et al.*, 2024).

2.3. Ekstraksi DNA dan PCR

Ekstraksi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya (Ariyanti dan Sianturi, 2019). Ekstraksi DNA meliputi tahapan *cell lysis*, *DNA binding*, *DNA washing*, dan *elution* (Artdita *et al.*, 2021). Ekstraksi DNA diawali dengan tahapan *cell lysis* atau proses penghancuran membran sel melalui penambahan enzim *Proteinase K* untuk merusak protein dan *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) untuk mengikat lipid sehingga membran sel rusak dan semua isi sel keluar (Kamaliah, 2017).

Binding merupakan tahapan untuk mengikat DNA agar dapat dipisahkan dari protein dan kontaminan lainnya dengan memanfaatkan senyawa seperti *fenol-kloroform* atau bahan lain yang berfungsi memisahkan DNA dari protein, lipid, dan RNA (Yustina *et al.*, 2025). Tahapan *Washing* bertujuan untuk menghilangkan kontaminan sehingga didapatkan DNA dengan kualitas yang baik (Weng *et al.*, 2020). Elusi merupakan tahap pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya, dalam hal ini berupa pelepasan DNA dari kolom silika (Ariyanti dan Sianturi, 2019).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode amplifikasi DNA secara *in vitro* yang dapat menghasilkan fragmen DNA spesifik dalam jumlah melimpah dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari template kompleks (Anggraeni, 2012). Metode PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template (94 – 95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50– 60°C) dan pemanjangan (72°C) (Setyawati dan Zubaidah, 2021).

2.4. Elektroforesis dan Sekuensing DNA

Elektroforesis gel DNA adalah teknik pemisahan molekul DNA berdasarkan ukuran fragmennya (Anam *et al.*, 2021). Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), seperti DNA, akan bergerak menuju kutub positif, sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (Nugraha *et al.*, 2014). Kecepatan perpindahan sampel pada proses elektroforesis ditentukan oleh muatan listrik,

ukuran, dan bentuk molekul yang dimilikinya (Fajri *et al.*, 2024). Elektroforesis memerlukan media pemisahan seperti gel agarosa yang dicampurkan dengan larutan buffer untuk mempertahankan pH sampel selama proses pemisahan berlangsung (Saiallagan *et al.*, 2022).

Sekuensing adalah teknik penentuan urutan nukleotida yang terdapat dalam materi genetik suatu spesies (Abdullah *et al.*, 2011). Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA (Tasma, 2015). Pengurutan (*sequencing*) asam nukleat memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Sekuensing DNA selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Lokapirnasari *et al.*, 2017).

2.5. Mutasi dan Keragaman Genetik

Mutasi merupakan perubahan pada materi genetik berupa gen atau kromosom dalam sel yang dapat diturunkan ke generasi berikutnya (Kinanti *et al.*, 2024). Mutasi titik terjadi ketika perubahan hanya mengenai satu nukleotida atau bagian kecil dari suatu gen (Febriana *et al.*, 2015). *Segregation site* merujuk pada posisi spesifik dalam sekumpulan urutan DNA homolog yang menunjukkan variasi nukleotida di antara individu atau sampel yang dibandingkan (Fu, 1995). *Segregation site* dibagi menjadi dua kategori, yakni *singleton site* dan *parsimony informative site*. *Singleton sites* adalah situs tunggal yang mengandung setidaknya dua jenis nukleotida, dengan satu nukleotida muncul lebih dari satu kali

(Zusriadi *et al.*, 2025). *Parsimony-informative* adalah suatu situs di mana terdapat setidaknya dua jenis karakter yang berbeda dengan frekuensi kemunculan minimal tertentu (Saha *et al.*, 2020).

Perubahan genetik dapat berupa substitusi, insersi, delesi, atau perubahan struktur kromosom yang dapat mengintervensi proses transkripsi maupun translasi. Kondisi ini dapat mengakibatkan terjadinya delesi, insersi, transisi dan transversi (Gaina *et al.*, 2023). Mutasi indel (*insertion/deletion*) merupakan bentuk mutasi genetik yang mencakup penambahan (*insertion*) atau pengurangan (*deletion*) satu atau lebih basa nitrogen pada sekuens DNA (Fauziah *et al.*, 2020). Mutasi transisi adalah penggantian basa nitrogen dengan basa yang memiliki struktur serupa, sementara mutasi transversi adalah penggantian basa dengan basa yang berbeda strukturnya (Aliyya *et al.*, 2020).

Keragaman genetik pada ternak menentukan kemampuan untuk merespons seleksi dan perubahan iklim, serta jejak iklim mereka (Wang *et al.*, 2025). Keragaman genetik memungkinkan peternak untuk mengembangkan sifat-sifat dengan karakteristik baru sebagai respons terhadap perubahan lingkungan dan penyakit (Koyun *et al.*, 2016). Keragaman genetik dapat diukur melalui heterozigositas, yaitu dengan menghitung proporsi individu heterozigot di dalam populasi (Arifin *et al.*, 2017).

2.6. Heterozigositas dan Hardy Weinberg

Heterozigositas merupakan nilai rata-rata dari persentase lokus heterozigot per individu, atau persentase rata-rata individu yang bersifat heterozigot dalam

populasi tersebut (Syarifulaya *et al.*, 2017). Heterozigositas terbagi menjadi kategori rendah ($<20\%$), sedang ($20-30\%$), dan tinggi ($>30\%$) (Indriani *et al.*, 2021). Nilai heterozigositas dapat dipengaruhi oleh mutasi, jumlah, pola perkawinan, migrasi dan seleksi (Meliyana *et al.*, 2024).

Kesetimbangan Hardy-Weinberg (HWE) adalah salah satu prinsip fundamental dalam genetika populasi yang menjelaskan bahwa frekuensi genotipe suatu populasi tidak akan mengalami perubahan dari satu generasi ke generasi berikutnya, selama tidak ada gangguan dari faktor eksternal (Neamatzadeh *et al.*, 2024). Kondisi kesetimbangan Hardy-Weinberg tercapai karena adanya perkawinan secara acak (*random mating*), ukuran populasi tidak terbatas, serta tidak adanya pengaruh mutasi, seleksi alam, migrasi, dan *genetic drift* (Meirmans, 2018).

BAB III

MATERI DAN METODE

Sampel diperoleh dari peternakan domba Dorper di Kabupaten Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus – November 2025 di Laboratorium Genetika, Pemuliaan dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 50 sampel darah domba Dorper yang terdiri dari 45 domba Dorper betina dan 5 domba Dorper jantan. Alat yang digunakan meliputi, *ice box*, tabung EDTA 3 ml, spuit 3 ml, alat tulis, label, *ice gel*, mikropipet, *microtip*, *microcentrifuge tube*, *collection tube*, *vortex*, *incubator*, *centrifuge*, *beaker glass*, erlenmeyer, timbangan, *microwave*, *gel tray*, *gel combs*, mesin elektroforesis horizontal, mesin *Gel Documentation System* (GDS), mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Bio-Rad T100, *PCR tube*, sarung tangan lateks, tabung eppendorf, *magnetic stirrer*. Bahan yang digunakan meliputi *DNA Isolation Kit*, *my taq polymerase HS red mix*, etanol, larutan TBE, *agarose gel*, *florosafe DNA stain*, *DNA ladder*, *PCR water* (DH₂O), aquades, *loading dye*, dan sepasang primer yaitu: F:5'- CAA AGT TGG TGA GAC GGC AG-3' dan R:5'- CCT TTG GGG TTT GCT TGG TG-3' yang didesain sendiri menggunakan Primer3 Plus. Proses desain primer dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode observasional. Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas tiga tahapan, yaitu pra penelitian, penelitian dan analisis data. Tahap penelitian terdiri dari beberapa tahapan meliputi tahap ekstraksi DNA, amplifikasi gen, elektroforesis dan sekuensing.

3.2.1. Tahap Pra Penelitian

Tahap pra penelitian meliputi tahapan persiapan alat dan bahan serta tahapan pengambilan sampel. Tahapan persiapan alat dan bahan dilakukan dengan memastikan alat dan bahan yang akan digunakan tersedia. Pemilihan sampel dilakukan dengan metode *purposive sampling* pada domba Dorper dengan kriteria kondisi kesehatan yang baik, domba Dorper *full blood* terverifikasi dokumen (*pedigree* peternakan) dan domba Dorper berumur 12 bulan – 36 bulan.

3.2.2. Tahap Penelitian

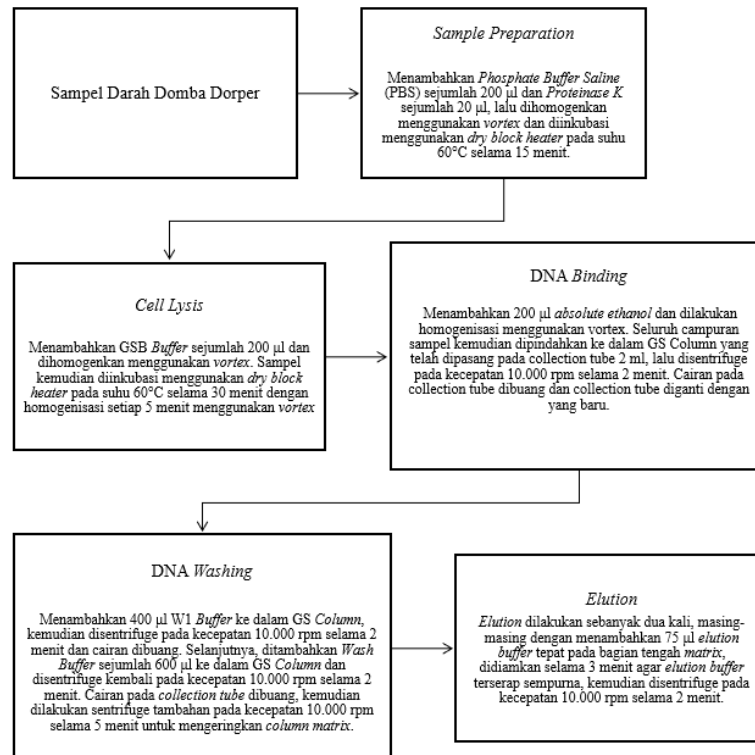
Sampel darah domba Dorper diambil sebanyak 3 ml melalui *vena jugularis* yang terletak pada bagian leher domba Dorper. Proses pengambilan darah domba Dorper diawali dengan mencukur bulu di sekitar leher untuk mengetahui letak *vena jugularis* domba sehingga memudahkan proses pengambilan darah. Kemudian bagian leher diusap menggunakan kapas yang telah diberi alkohol. Sampel darah kemudian diambil menggunakan spuit ukuran 3 ml dan selanjutnya disimpan di dalam tabung EDTA untuk mencegah koagulasi. Tabung EDTA yang berisi darah

kemudian disimpan di dalam *ice box* yang terdapat *ice gel* didalamnya yang berfungsi untuk mempertahankan suhu dingin.

Ekstraksi DNA terdiri dari empat tahap utama yakni *sel lysis*, *DNA binding*, *DNA washing* dan *elution*. Tahap ekstraksi DNA menggunakan protokol *Genomic DNA Extraction Kit* dari Geneaid. Sampel darah domba sejumlah 200 µl diambil dari tabung EDTA menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam *microcentrifuge tube*.

Sampel kemudian dicampur dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sejumlah 200 µl dan *Proteinase K* sejumlah 20 µl. Sampel kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan dilakukan inkubasi menggunakan *dry block heater* dengan suhu 60 °C selama 15 menit. Setelah itu, sampel ditambahkan GSB Buffer sejumlah 200 µl dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Sampel kemudian dilakukan inkubasi menggunakan *dry block heater* pada suhu 60°C selama 30 menit dan setiap 5 menitnya dilakukan *vortex*.

Sampel kemudian ditambahkan 200 µl *absolute ethanol* dan dilakukan homogenisasi menggunakan *vortex*. Setelah itu, pasang GS *Column* pada *collection tube* 2 ml dan pindahkan seluruh sampel dari *microcentrifuge tube* ke dalamnya. Sampel yang telah dipindahkan dalam GS *Column* kemudian dilakukan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah proses sentrifuge selesai, cairan yang terdapat di *collection tube* dibuang dan pasang *collection tube* baru pada GS *Column*.



Ilustrasi 1: Tahapan Ekstraksi DNA

Sampel kemudian ditambahkan 400 µl W1 *buffer* pada GS *Column* dan dilakukan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Buang cairan yang terdapat di *collection tube*. Kemudian *wash buffer* sejumlah 600 µl ditambahkan ke dalam GS *Column* dan setelah itu dilakukan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Buang cairan yang terdapat di dalam *collection tube*. Sampel dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit untuk mengeringkan *column matrix*.

Setelah *column matrix* kering, GS *Column* kemudian dipindahkan dalam *microcentrifuge tube* dan ditambahkan 75 µl *elution buffer* pada bagian tengah *matrix*. Diamkan selama 3 menit untuk mempersilahkan *elution buffer* terserap. Setelah itu, dilakukan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit untuk

mengelusi DNA murni. Kemudian ditambahkan lagi 75 µl *elution buffer* pada bagian tengah *matrix*. Diamkan selama 3 menit selanjutnya dilakukan sentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, hasil ekstraksi DNA akan dilakukan pengujian elektroforesis menggunakan gel agarose 1% pada tegangan 100 volt selama 27 menit. Hasil elektroforesis akan divisualisasikan melalui sinar UV menggunakan *Gel Documentation System* (GDS).

Amplifikasi gen dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Metode PCR adalah salah satu metode untuk memperbanyak untai DNA menggunakan sepasang primer dengan kondisi suhu yang telah diatur. Campuran PCR meliputi DNA *template* sejumlah 3 µl, *my taq polymerase HS red mix* 25 µl, primer *forward* 1 µl, primer *reverse* 1 µl dan PCR *Water* 20 µl dimasukkan dalam PCR tube. Setelah itu, homogenisasi campuran PCR tersebut dengan *vortex*. Kemudian campuran PCR dimasukkan dalam mesin PCR Bio-Rad T100. Tahapan PCR terdiri atas *initial denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, dan *final extension*. Tahapan PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tahapan *Polymerase chain reaction*

Tahap	Suhu (C)	Waktu (detik)	Siklus
Initial denaturation	95	60	1
Denaturation	95	15	40
Annealing	55,9	15	40
Extension	72	35	40
Final Extention	72	300	1

Hasil PCR diperoleh amplicon dengan panjang 1078 bp yang berada pada parsial intron 2 dan parsial exon 3. Selanjutnya, dilakukan pengujian menggunakan gel agarose 1% pada elektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 27 menit dan

kemudian divisualisasikan menggunakan *Gel Documentation System* (GDS).

Simulasi penempelan primer pada analisis PCR dapat dilihat pada ilustrasi 2.



Ilustrasi 2: Simulasi penempelan primer pada analisis PCR

Keterangan: Urutan Berdasarkan Genbank (Accession Number: MH025940); Highlight kuning: Penempelan primer; Highlight Hijau: Parsial dari Intron 2; Highlight Biru: Parsial dari Exon 3.

Tahap Sekuensing dilaksanakan di PT. Genetika Science Indonesia. DNA sekuensing adalah proses penentuan sekuens basa nukleotida (adenin, timin, sitosin dan guanin) dalam suatu DNA. Sekuensing ini menggunakan metode Sanger. *Sanger sequencing* atau *chain termination method* merupakan teknik molekular dalam mendeteksi komposisi nukleotida yang spesifik (*exact*) dari fragmen DNA yang diamplifikasi dengan PCR. Metode sekuensing Sanger memiliki akurasi yang tinggi dan kemampuan untuk mengurutkan sampel DNA dalam jumlah yang sangat sedikit (Al-Shuhaib dan Hashim, 2023).

3.2.3 Analisis Data

Analisis data hasil sekuensing dilakukan menggunakan software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versi 12 (MEGA 12). Hasil dari analisis data menggunakan MEGA 12 menunjukkan bahwa terdapat 8 sampel yang tidak bisa dilanjutkan untuk analisis dikarenakan kualitas sekuensing yang kurang baik. Identifikasi mutasi gen MSTN dilakukan berdasarkan perubahan sekuens nukleotida dan asam amino sampel dibandingkan dengan sekuens referensi yang tersedia di GenBank. Analisis keragaman genetik dilakukan menggunakan software DnaSP.

Keragaman genetik diukur menggunakan nilai heterozigositas (H) dan frekuensi alel (P_i). Nilai H menunjukkan proporsi individu heterozigot dalam populasi, sementara P_i adalah frekuensi alel ke- i dari total k alel yang ada. Frekuensi alel dari alel pertama ditandai dengan huruf p , sedangkan frekuensi alel dari alel kedua ditandai dengan huruf q , dengan hubungan keduanya memenuhi

persamaan $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Distribusi genotipe selanjutnya diuji untuk menentukan Kesetimbangan Hardy-Weinberg (HWE) menggunakan analisis Chi-kuadrat (Lestari *et al.*, 2020).

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k P_i$$

Keterangan: H : nilai heterozigositas, P_i : frekuensi alel ke- i ; k : jumlah total alel.

$$X^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$

Keterangan: X^2 : nilai Chi-kuadrat, O_i : frekuensi genotipe yang diamati, e_i : frekuensi genotipe yang diharapkan.